Resistenzverhalten von Staphylococcus Aureus gegen Rifamycine

Erna Hattar

1971

AUS DEM MAX V. PETTENKOFER-INSTITUT FÜR HYGIENE UND MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. Dr. H. Eyer

RESISTENZVERHALTEN VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS GEGEN RIFAMYCINE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximillians-Universität zu München

vorgelegt von
ERNA H A T T A R
aus Waldkraiburg

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Linzenmeier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Eyer
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	20.7.1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Literarische Besprechung	2
Eigene Untersuchungen	6
Ergebnisse	1o
Diskussion	28
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	34

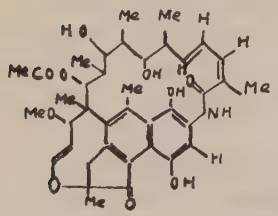
I) Einleitung

Die Rifamycine wurden als antibiotisch wirksame Substanzen von P. Sensi und Mitarbeitern (28) (Forschungslaboratorien der Firma Lepetit, Mailand) aus Stoffwechselprodukten von Streptomyces mediterranei entdeckt und als A-, B-, C-, D- und E-Rifamycine bezeichnet. (27)
Von Rifamycin B ausgehend, das sich als wirksamstes der genuinen Rifamycine erwies, konnten bis jetzt mehr als 15o halbsynthetische Rifamycine erhalten werden, indem man auf chemischen Wege einige funktionelle Gruppen abänderte. (29)
Zu diesen halbsynthetischen Rifamycinen zählen Rifamycin SV und Rifamycin M_{14}.
Timbal, Pallanza und Carnitti (3o) beschrieben 1961 die gute antibakterielle Wirksamkeit von Rifamycin SV gegen grampositive Keime, vorallem gegen Staphylo- und Streptokokken. Seitdem wurde Rifamycin SV in zahlreichen in vitro- und in vivo-Versuchen erprobt und außerhalb Deutschlands unter dem Namen Rifocin^{R} in die klinische Praxis eingeführt.
Über Rifamycin M_{14} ist dagegen sehr wenig bekannt.
Füresz und Timbal (7) beschrieben die hohe Wirksamkeit des Antibiotikums gegen grampositive Keime und eine sehr gute Wirksamkeit gegen M. tuberculosis. In ihren Untersuchungen über die antibakteriellen Wirkungsspektren der Rifamycine wird die minimale Hemmkonzentration des Rifamycin M_{14} gegen Streptococcus hämolyt., gegen Strept. faecalis, E. coli und gegen Mycobact. tuberculosis niedriger angegeben, als die minimale Hemmkonzentration des Rifamycin SV.

II) Literarische Besprechung

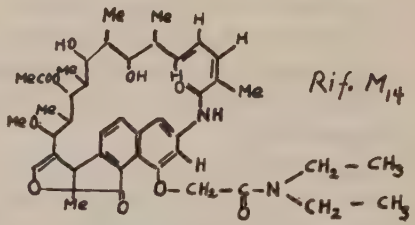
1. Konstitution der Rifamycine

Wie bereits erwähnt, zählen Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} zu einer Gruppe halbsynthetischer Verbindungen, die sich von dem genuinen Rifamycin B ableiten. Rifamycin SV ist ein Reaktionsprodukt der Oxydo-Reduktion und Hydrolyse des Rifamycin B, Rifamycin M_{14} ist sein Diäthylamid. (27)



Rif. SV

$C_{34}H_{47}NO_{12}$



Rif. M_{14}

$C_{43}H_{58}N_2O_{13}$

W. v. Oppolzer (2o) gelang es, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von P. Sensi und Mitarbeitern, durch chemischen Abbau und darauffolgende spektroskopische Untersuchung der Abbauprodukte, die Konstitutionsformel der Rifamycine aufzustellen.
Aus der Konstitutionsformel folgt, daß es sich bei den Rifamycinen um aromatische Verbindungen handelt, die durch eine längere aliphatische Kette unter Entstehung eines 24-Ringes überbrückt werden.
Solche überbrückte Verbindungen werden ansa-Verbindungen genannt und wurden bisher in der Natur nicht gefunden.
Somit ist die Konstituion der Rifamycine von derjenigen der bisher bekannten Antibiotika wesentlich verschieden.

2. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Rifamycine

Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} sind monobasische Säuren. (22)
Ihre Na-Salze liegen in orange-farbenen Kristallen vor, die sich als Rifamycin SV-Na-Salz zu 5% in Wasser lösen, als Rifamycin M_{14}-Na-Salz zu 2o% bei annähernd neutralem pH (7,2).
Schwach löslich sind sie in Methanol, Äthanol, Azeton und Äthyl-

-azetat. Die freien Säuren sind dagegen in Methanol, Äthanol, Azeton, Chloroform und Äthylazetat gut löslich.
Die wässrigen Lösungen von Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} sind wenig stabil. Rifamycin SV z.B. hat die Tendenz in Rifamycin S überzugehen, bis sich ein Gleichgewicht des reversiblen Oxydations- und Reduktionsverlaufes eingestellt hat.
Dies kann durch Zusatz von geeigneten Reduktionsmitteln , wie z.B. Ascorbinsäure, verhindert werden. (4,15)
Curci (4,5) entdeckte, daß das niedere Molekulargewicht des PVP (Polyvenylpyrrolidin) das geeignetste Vehikel für die Therapeutische Anwendung des Rifamycin SV sei, da es die lokale Verträglichkeit des Antibiotikums erheblich steigere und eine verbesserte Resorbtion erziele.

3. Antibakterielle Wirksamkeit

Rifamycin SV besitzt eine hohe antibakterielle Wirksamkeit nicht nur gegen gram-positive Bakterien, sondern auch gegen Mycobact. tuberculosis. (19) Diese Eigenschaft unterscheidet Rifamycin SV von allen anderen gegen gram-positive Bakterien wirksamen Antibiotika. Monnier und Bourse (16) berichten, daß von 1o4 getesteten Staphylokokkenstämmen 66% bei Konzentrationen von o,o1 mcg/ml gehemmt wurden. Diese niedrigen minimalen Hemmkonzentrationen konnten in solcher Regelmäßigkeit mit keinem anderen Antibiotikum erreicht werden (1,9).
Dabei ist die Wirksamkeit des Antibiotikums gegen koagulase-positive, wie gegen koagulase-negative Stämme dieselbe.
Eine ähnlich gute Wirksamkeit wurde gegen Streptokokken und M. tuberculosis beobachtet. Streptokokkenstämme wurden mit Konzentrationen von o,oo1 mcg/ml - o,1 mcg/ml gehemmt. (32)
93% von 15o getesteten Stämmen von M. tuberculosis wurden in Konzentrationen von o,o1 mcg/ml - o,1 mcg/ml gehemmt. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 1 mcg/ml wurden alle untersuchten Stämme gehemmt. (19)
Höhere Rifamycinkonzentrationen von 1o mcg/ml bis 1oo mcg/ml hemmen mit großer Regelmäßigkeit auch gram-negative Bakterien. (3,9,18) Rifamycin SV erweist sich voll wirksam gegen gram-positive, gram-negative und Myco-Bakterien, die gegen ein oder mehrere

Antibiotika resistent sind. (1,9,11,17,21,3o) Dieses Fehlen einer Kreuzresistenz mit anderen Antibiotika wird auch von anderen Autoren angegeben. Staphylokokkenstämme, die gegen verschiedene Antibiotika resistent gemacht wurden, erwiesen Rifamycin SV gegenüber ihre ursprüngliche Empfindlichkeit.
Die Wirkungsweise des Antibiotikums konnte bisher nur zum Teil geklärt werden. Es werden Beeinträchtigung der Bakterienatmung und ihrer Proteinsynthese angenommen. (8)

4. Pharmakologische Eigenschaften

Bei Versuchen mit verschiedenen Tiergattungen wurde für Rifamycin SV eine sehr geringe Toxizität festgestellt. Die parenterale LD_{50} ergab Werte bis zu 112o mg/kg. (2,14,26)
Bei Ratten, denen über 6 Monate tägliche Dosen von 5o mg/kg bis 3oo mg/kg verabreicht wurden, traten keinerlei Anzeichen einer Toxizität auf. (14,22) Die therapeutische Breite des Antibiotikums kann daher als außergewöhnlich gut bezeichnet werden.
Diese Ergebnisse bestätigen die biochemischen Daten, nach welchen sich die antibakterielle Wirksamkeit von Rifamycin SV schon bei Konzentrationen entfaltet, die weit unter denen liegen, die sonst zur Beeinflussung des Stoffwechselgeschehens in tierischen Geweben erforderlich sind.

5. Absorption, Verteilung und Ausscheidung

Absorption:
Bei oraler Verabreichung waren Dosen von 5o mg/kg notwendig, um brauchbare Blut- und Gewebsspiegel zu erzielen. (14) Einer der Gründe für diese Tatsache mag die Umwandlung des Rifamycin-Salzes in die wenig lösliche freie Säure sein. Intramuskuläre Injektionen von 4o mg/kg ergaben bei Ratten Blutspiegel von 26,2 mcg/ml nach einer Stunde. (6)

Verteilung:
Bei Hunden wurde eine Stunde nach i.m.-Injektion von 5o mg/kg der Großteil des im Blut vorhandenen Antibiotikums im Plasma gefunden und nur ein geringer Anteil (5% - 13%) in den roten

Blutkörperchen. (12)
Rifamycin SV erscheint rasch nach parenteraler Applikation in hohen Konzentrationen in der Leber, von der es in die Galle ausgeschieden wird. In der Lunge ist die Konzentration niedriger als in Blut und Leber.

Ausscheidung:
Die Ausscheidung von Rifamycin SV erfolgt hauptsächlich über die Galle. (12,13) Die Ausscheidungskapazität der Leber erreicht einen Sättigungsschwellwert, über den hinaus die Konzentration in der Galle sich nicht verändert, selbst wenn die Dosis erhöht wird, während der Serumspiegel viel höhere Werte erreicht.
Das mit der Galle eliminierte Antibiotikum wird zum Teil im Intestinaltrakt rückresorbiert und gelangt mit dem Pfortaderblut wieder zur Leber.
Die Rifamycinkonzentrationen in der Galle übersteigen bei weitem die minimalen Hemmkonzentrationen für die meisten gram-negativen Mikroorganismen.
Bei der Ausscheidung des Antibiotikums im Harn kommt es zu keiner Sättigung. Die Werte steigen im Verhältnis zum Blutspiegel.

III) Eigene Untersuchungen

1. Aufgabenstellung

Es war Aufgabe dieser Arbeit, Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} gegen 1962 aus menschlichem Untersuchungsmaterial gezüchtete Staphylokokken zu testen und ihre Wirkungsweise zu vergleichen. Diese Versuche wurden 1965 durchgeführt.
Gleichzeitig wird darüber berichtet, wie sich diese Staphylokokkenstämme gegen Rifamycin M_{14} und Rifamycin SV verhalten, welche minimalen Hemmkonzentrationen ermittelt wurden und welche Beobachtungen bei in vitro-Versuchen zur Resistenzsteigerung gemacht wurden.
Dem Auftreten von Subkulturen innerhalb eines Hemmhofes wurde besondere Beachtung geschenkt.

2. Material und Methodik

Mit Ausnahme des Vergleichstammes Nr. 1 (SG 511), wurden 1962 isolierte, koagulasepositive Stämme von S. aureus aus dem Münchner Einzugsgebiet geprüft.

Die Stämme zeigten folgende Resistenzbilder:

Stamm Nr. 1	SG 511	vollempfindlich
Nr. 3	5800/62	vollempfindlich
Nr. 9	5870/62	vollempfindlich
Nr.10	5877/62	vollempfindlich
Stamm Nr. 2	5894/62	resistent gegen P S
Nr. 4	W536/62	resistent gegen P S
Nr. 5	5863/62	resistent gegen P S T E
Nr. 6	5740/62	resistent gegen P S T
Nr. 7	W526/62	resistent gegen P S T C
Nr. 8	5862/62	resistent gegen P

Seinerzeit isolierte, gegen Rifamycin SV innerhalb eines Hemmhofes gewachsene resistente Varianten wurden als R-Stämme bezeichnet.

Die R-Stämme zeigten nun folgende Resistenzbilder:

Stamm Nr. 1R	vollempfindlich
Nr. 3R	vollempfindlich
Nr. 9R	vollempfindlich
Nr.1oR	vollempfindlich
Stamm Nr. 4R	resistent gegen S C
Nr. 5R	resistent gegen P S T E
Nr. 6R	resistent gegen P
Nr. 7R	resistent gegen P S T
Nr. 8R	resistent gegen P

Hemmhoftest:

Die Resistenzbestimmung wurde mit einer vereinfachten Hemmhofmethode mittels einer zahnradförmigen Testscheibe durchgeführt.(1o) Die im Rahmen dieser Resistenzbestimmung verwendeten Zahnräder bestanden jeweils aus Satz I, zur Testung grampositiver Erreger und Neisserien und aus Satz II, durch Methylenblau markiert, zur Testung aller Keimarten.
Die oben genannten 19 Stämme wurden im Hemmhoftest mit Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} getestet.
Eine Peptonbouillon wurde jeweils mit dem entsprechenden Stamm mittels einer Öse von 4 mm lichter Weite beimpft und nach 4 stündiger Bebrütung bei 37°C auf peptonfreiem Fleischwasseragar mit o,1% Glucosezusatz (11) ausgespatelt. Die von der Firma Lepetit verwendeten Testplättchen von 9 mm Durchmesser enthielten jeweils 3o µg Rifamycin SV bzw. 3o µg Rifamycin M_{14}.
Die Nährmedien wurden ohne Prädiffusion bei 37°C bebrütet und nach 24- bzw. 48-stündiger Bebrütung abgelesen.
Die nach 24-stündiger Bebrütung innerhalb des Hemmhofes aufgetretenen Kolonien wurden erneut in Peptonbouillon abgeimpft und nach

4-stündiger Bebrütung auf Schrägagar ausgestrichen und je nach Testsubstanz und Orginalstamm als z.B Stamm Nr. 2 SV bezeichnet, d.h.,: Resistente Variante aus Stamm Nr. 2, isoliert aus einer Einzelkolonie innerhalb seines Hemmhofes bei Testsubstanz Rifamycin SV.
Mit diesen resistenten Varianten wurden erneut die Resistenzbestimmung mit der Zahnradmethode, wie bereits beschrieben und ebenso der Hemmhoftest, wie oben angegeben, mit beiden Testsubstanzen durchgeführt.

Plattenverdünnungstest:

Im folgenden Arbeitsgang wurde eine Stammlösung von 4o µg/ml Rifamycin M_{14} hergestellt. In 15 Reagenzgläser wurde je 1 cm^3 Lösungsmittel pipetiert. Von der Stammlösung wurde 1 ml mittels einer Pipette entnommen und dem 1. Röhrchen zugesetzt. Von diesem wurde wiederum 1 ml entnommen und in das jeweils nächste Reagenzglas pipetiert.
Auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe des Antibiotikums in den fallenden Konzentrationen von 2o µg/ml, 1o µg/ml..... bis zu o,oo12 µg/ml gewonnen.
Einem, jeweils 4o ml flüssigen, peptonfreien Fleischwasseragar mit o,1% Glucosezusatz enthaltendem Meßkölbchen wurde das Antibiotikum in den oben angegebenen fallenden Konzentrationen zugesetzt. Aus jedem Kölbchen wurden 4 Petrischalen gegossen. Diese wurden getrocknet und mit den oben genannten Staphylokokkenstämmen in der Verdünnung 1 : 1o, 1 : 1oo, 1 : 1ooo, bis 1 : 2 Million beschickt. Zusätzlich wurde je eine Kontrollplatte, die kein Antibiotikum enthielt, mit den erwähnten Bakterienverdünnungen jedes Stammes beimpft.
Die Bakterienverdünnungen wurden auf folgende Weise hergestellt: In 6 Reagenzgläser wurden je o,9 ml physiologische NaCl-Lösung pipetiert. o,1 ml einer, über 5 Stunden bebrüteten Bakterienbouillon wurde dem 1. Röhrchen zugegeben. Dem so entstandenem Gemisch aus NaCl-Lösung und Bakterienbouillon wurde o,1 ml entnommen und dem 2. Röhrchen zugegeben. Von dem 2. wurde o,1 ml in das 3. Röhrchen pipetiert, usw...

Reihenverdünnungstest:

Der Reihenverdünnungstest wurde in Peptonbouillon mit 24-Stunden alten Bouillonkulturen in den Bakterienverdünnungen 1 : 1ooo durchgeführt. Zur Durchführung des Reihenverdünnungstestes wurden 14 Reagenzgläser und 1 Kontrollröhrchen in neun hintereinanderstehenden Reihen angeordnet. In das 1. Röhrchen der ersten Reihe wurden 9 ml Bouillon pipetiert, in jedes folgende der ersten Reihe, einschließlich Kontrollröhrchen , wurden 5 ml pipetiert.
Dann wurden diesem ersten, 9 ml Bouillon enthaltendem Röhrchen, 1 ml Rifamycin M_{14} von der Stammlösung 16o µg/ml zugefügt. Von diesem Bouillon-Rifamycin M_{14}-Gemisch wurden 5 ml entnommen und in das 2. Röhrchen pipetiert. Dieser Vorgang wiederholte sich bei allen folgenden Röhrchen der ersten Reihe. Schließlich wurden jedem Röhrchen der ersten Reihe 4 ml mittels Pipette entnommen und davon je 1/2 ml in die acht hintereinander stehenden Röhrchen jeder Reihe pipetiert.
Die Röhrchen wurden dann mit 24-Stunden alten Bouillonkulturen in der Verdünnung 1 : 1ooo beimpft und erstmalig nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C und an 6 aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von je 24 Stunden abgelesen.
Von den Kulturen, die nach dieser 6-tägigen Bebrütung kein Wachstum zeigten, wurden zur Prüfung der Bakterizidie Subkulturen angelegt, d.h., sie wurden auf antibiotikafreie Nährböden abgeimpft und wiederum nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C an 4 aufeinanderfolgenden Tagen abgelesen.

3. Ergebnisse

Im Hemmhoftest: betrug die Hemmhofgröße der Stämme nach 24-stündiger Bebrütung gegenüber beiden Testsubstanzen zwischen 3o mm und 46 mm.
Bei vielen Stämmen verkleinerten sich die Hemmhöfe konzentrisch nach weiterer Bebrütung über 48 und 72 Stunden durch Nachwachsen am Hemmhofrand.
Die nach jeweils 24-, 48- und 72-stündiger Ablesung ermittelten Hemmhofgrößen der 1o Orginal- und der 9 R-Stämme sind in Tabelle I und in Tabelle II angegeben.

Stamm	24std.		48std.		72std.	
Nr.	SV	M_{14}	SV	M_{14}	SV	M_{14}
1	34	36	34	36	34	3o
2	42	48	42	48	42	48
3	38	36	34	34	3o	28
4	36	36	36	36	36	36
5	34	32	34	3o	34	28
6	38	3o	38	24	38	2o
7	38	46	38	46	38	46
8	32	34	28	26	28	26
9	34	38	3o	28	26	2o
1o	3o	3o	29	16	22	1o

Tab. I: Hemmhoftest der Orginalstämme. Testsubstanz: 3o µg Rifamycin SV bzw. Rif. M_{14}
Hemmhofdurchmesser in mm.
Ablesung nach 24,48 u. 72std.

Stamm	24std.		48std.		72std.	
Nr.	SV	M_{14}	SV	M_{14}	SV	M_{14}
1R	4o	4o	4o	28	4o	28
3R	38	38	38	38	38	38
4R	3o	38	3o	38	3o	38
5R	4o	44	32	44	32	44
6R	38	32	38	32	38	32
7R	4o	4o	4o	4o	4o	4o
8R	46	42	46	42	46	42
9R	34	34	34	34	34	34
1oR	4o	34	4o	34	4o	34

Tab. II: Hemmhoftest der R-Stämme. Testsubstanz: 3o µg Rif. SV bzw. Rifamycin M_{14}.
Hemmhofdurchmesser in mm.
Ablesung nach 24, 48 u. 72std.

Die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten nach 24-, 48- und 72-stündiger Ablesung, wie in Tabelle IIIa und IIIb angegeben, wurden nach folgenden Formeln berechnet. (Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Formel 2c, S. 28, 1955)

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \cdot \left(S(x^2) - \frac{(Sx)^2}{N} \right) ; \qquad Vc = \frac{s \cdot 100}{X} \%$$

Erklärung der Symbole:

S = Summe der Einzelwerte

$\overline{X}$ = Mittelwert des ersten Kollektives

N = Anzahl der Fälle

s = Standardabweichung

1σ = 1 Sigmabereich

2σ = 2 Sigmabereiche

Vc = Variationskoeffizient

	24 std.	48 std.	72 std.
S	356	343	333
X	35,6	34,3	33,3
N	1o	1o	1o
s	3,51	4,42	5,42
1	32,o9-39,11	29,88-38,72	27,88-38,72
2	28,58-42,62	25,46-43,14	22,46-44,14
Vc	9,86%	12,88%	16,27%
	Rifamycin SV		

Tab. IIIa: Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Hemmhofdurchmesser der Orginalstämme bei Testsubstanz 3o ug Rifamycin SV.

	Rifamycin M_{14}		
	24std.	48std.	72std.
s	366	322	29o
$\bar{x}$	36,6	32,2	29,o
N	1o	1o	1o
s	6,12	9,73	11,8
1σ	3o,48-42,72	22,47-41,93	17,2o-4o,8o
2σ	24,36-48,84	12,74-51,66	5,4o -52,6o
Vc	16,66%	3o,2%	4o,96%

Tab. IIIb: Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Hemmhofdurchmesser der Orginalstämme bei Testsubstanz 3o µg Rifamycin M_{14}. Ablesung nach 24, 48 u. 72 Stunden.

Wie aus den Tabellen IIIa und IIIb ersichtlich ist, steigen die Abweichungen und die Variationskoeffizienten für Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} mit der Ablesungszeit an.
In den Abbildungen Ia und Ib sind die Mittelwerte der Hemmhofgrößen und ihre Abweichungen graphisch dargestellt.
Aus dem Vergleich beider Tabellen und Abbildungen geht hervor, daß die Abweichung vom Mittelwert und der Variationskoeffizient von Rifamycin SV flacher und regelmäßiger ansteigen, als die von Rifamycin M_{14}, beide Kurven aber einen ähnlichen Verlauf aufweisen.

Tabelle IVa und IVb zeigen das Verhalten der Hemmhöfe der R--Stämme, ausgedrückt in den Abweichungen und Variationskoeffizienten.

Abb. Ia: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, deren Abweichungen u. Variationskoeffizienten in Abhängigkeit zur Ablesungszeit bei Rif. SV im Hemmhoftest der Orginalstämme.

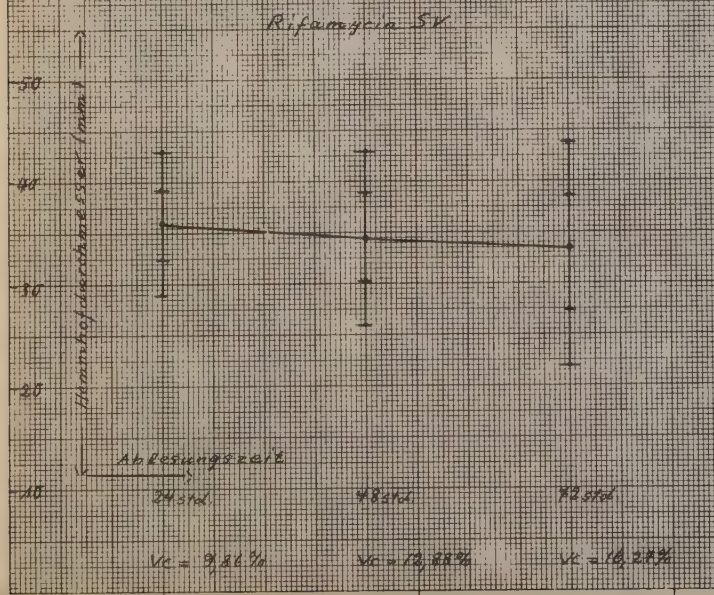
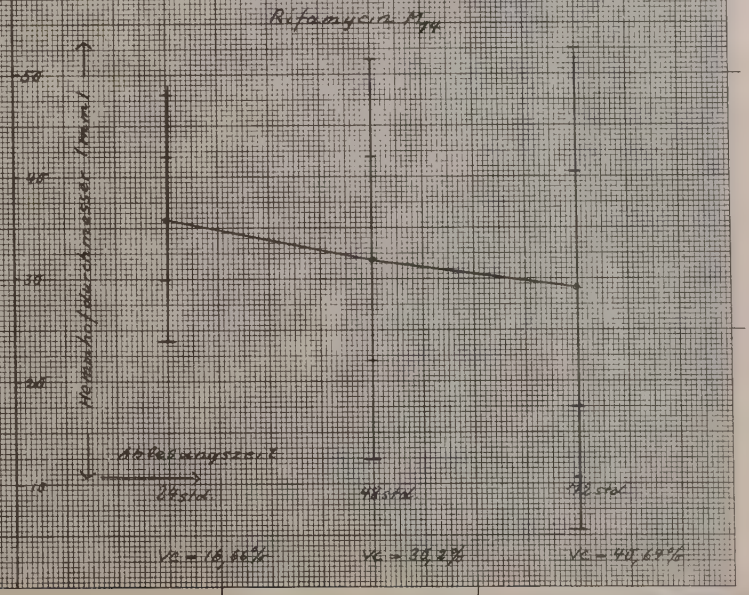


Abb. Ib: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, deren Abweichungen u. Variationskoeffizienten in Abhängigkeit zur Ablesungszeit bei Rif. M_{14} im Hemmhoftest der Orginalstämme.



Best.-Nr. 1280

	24std.	48std.	72std.
S	346	338	338
N	9	9	9
$\bar{X}$	38,44	37,55	37,55
s	4,45	4,86	4,86
1δ	34,o-42,9	32,7-42,4	32,7-42,4
2δ	29,5-37,3	27,8-47,3	27,8-47,3
Vc	11,57%	12,68%	12,68%
	Rifamycin SV		

Tab. IVa: Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Hemmhofdurchmesser der R-Stämme bei Testsubstanz 3o µg Rifamycin SV. Ablesung nach 24,48 und 72Stunden.

	24std.	48std.	72std.
S	342	33o	33o
N	9	9	9
$\bar{X}$	38,oo	36,66	36,66
s	4,oo	5,1o	5,1o
1δ	34,o-42,o	31,6-41,8	31,6-41,8
2δ	3o,o-46,o	26,5-46,9	26,5-46,9
Vc	1o,53%	15,45%	15,45%
	Rifamycin M_{14}		

Tab. IVb: Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Hemmhofdurchmesser der R-Stämme bei Rif. M_{14}. Ablesung nach 24, 48 und 72 Stunden.

Die Mittelwerte aus den Hemmhofgrößen der R-Stämme und ihre Abweichungen sind in Abbildung IIa und IIb graphisch dargestellt. Im Vergleich mit Abbildung Ia und Ib weisen die Mittelwerte in Abb. IIa und IIb einen konstanteren Verlauf und eine geringere Abweichung auf.

Die Prüfung der Signifikanz (P), der Differenz der Mittelwerte von Abb. Ia und Abb. Ib, haben wir nach folgenden Formeln berechnet. (Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Formel 18, S. 5, 1955)

$$t = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{s_D} \quad ; \qquad \text{Freiheitsgrad } n = N + N - 2$$

$$s^2_{x,x'} = \frac{S(x^2) - \bar{X}S(x) + S(x'^2) - \bar{X}'S(x')}{N + N' - 2}$$

$$\hat{s}^2_D = \frac{s^2_{x,x'}}{N} + \frac{s^2_{x,x'}}{N}$$

Zeichenerklärung:

t	=	Abweichung
s_D	=	Standardabweichung der Mittelwertdifferenz
$\bar{X}$	=	Mittelwert des ersten Kollektives
$\bar{X}'$	=	Mittelwert des zweiten Kollektives
N	=	Anzahl der Fälle
$s^2_{x,x'}$	=	gemeinsame Streuung der beiden Kollektive
$S(x)$	=	Summe der Einzelwerte
$S(x^2)$	=	Summe der Quadrate der Einzelwerte
$(Sx)^2$	=	Quadrate der Summe der Einzelwerte

Abb. IIa: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, deren Abweichungen u. Variationskoeffizienten in Abhängigkeit zur Ablesungszeit bei Rif. SV im Hemmhoftest der R-Stämme.

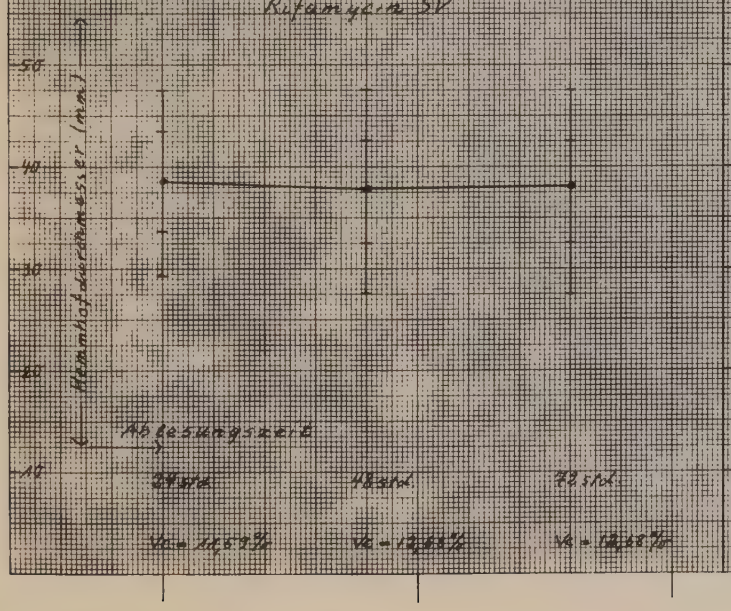
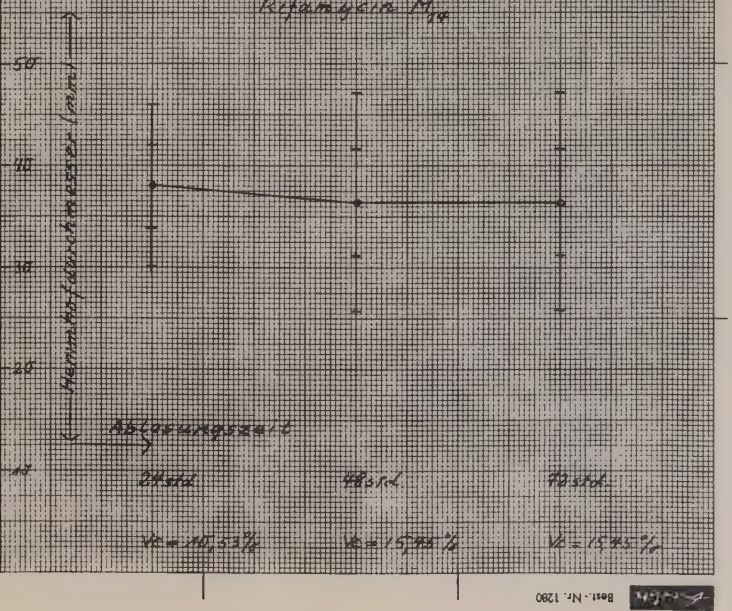


Abb. IIb: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, deren Abweichungen u. Variationskoeffizienten in Abhängigkeit zur Ablesungszeit bei Rif. M_{14} im Hemmhoftest der R-Stämme.



Best.-Nr. 1280

Rifamycin $M_{14}/24^h$ verglichen mit Rif.$M_{14}/48^h$; t = 1,213
o,3 < P > o,2 = nicht signifikant

Rifamycin $M_{14}/24^h$ verglichen mit Rif.$M_{14}/72^h$; t = 1,81
o,1 < P > o,o5 = nicht signifikant

Rifamycin SV/24^h verglichen mit Rif.SV/ 48^h ; t = o,4o6
o,7< P > o,6 = nicht signifikant

Rifamycin SV/24^h verglichen mit Rif. SV/72^h ; t = 1,133
o,3 < P > o,2 = nicht signifikant

Rifamycin $M_{14}/24^h$ verglichen mit Rif. SV/24^h ; t = o,45o2
o,7 < P > o,6 = nicht signifikant

Rifamycin $M_{14}/48^h$ verglichen mit Rif. SV/48^h ; t = o,8824
o,4 < P > o,3 = nicht signifikant

Rifamycin $M_{14}/72^h$ verglichen mit Rif. SV/72^h ; tt = 11,o5
o,4 < P > o,3 = nicht signifikant

Die Abnahme der Wirkung des Antibiotikums, als deren Ausdruck die Verkleinerung der Hemmhöfe nach 48- und 72-stündiger Bebrütung angesehen werden kann, ist weder für Rifamycin SV noch für Rifamycin M_{14} signifikant.
Auch der Vergleich der Antibiotika untereinander weist keine Signifikanz auf.

Resistente Varianten im Hemmhoftest:

Bei den, gegen die üblichen Antibiotika vollempfindlichen Stämmen, traten bereits nach 24-stündiger Bebrütung innerhalb der Hemmhöfe sowohl gegenüber Rifamycin SV als auch gegenüber Rifamycin M_{14} Einzelkolonien auf. Diese Kolonien wurden isoliert und nach Stammnummer und Testsubstanz als zB. 3 SV, 9 M, 1o SV usw. bezeichnet. Nach 3- bis 4-tägiger Bebrütung konnten bei fast allen Stämmen innerhalb der Hemmhöfe Einzelkolonien beobachtet werden. Diese erwiesen sich jedoch bei einer erneuten Durchführung des Hemmhoftestes als nicht regelmäßig resistent. Und zwar konnte eine Abhängigkeit des Resistenzgrades dieser Einzelkolonien von dem Zeitpunkt ihres Auftretens im Hemmhof und ihres Abstandes vom Testplättchen beobachtet werden. Einzelkolonien, die bereits nach 24 Stunden sichtbar waren, mit einer Entfernung von 5 mm bis zu 1o mm, erwiesen sich bei einer erneuten Durchführung des Hemmhoftestes als völlig resistent. Kolonien, die dagegen erst nach 3- bis 5-tägiger Bebrütung sichtbar wurden, zeigten im wiederholten Hemmhoftest Hemmhöfe von 3o mm bis 4o mm Durchmesser, waren also voll empfindlich, in denen wiederum nach 3- bis 5-tägiger Bebrütung Einzelkolonien auftraten.
Als resistente Varianten mit bleibender Resistenz gegen Rifamycin M_{14} und Rifamycin SV erwiesen sich die isolierten Stämme:

3 M, 5 M, 6 M, 8 M, 1o M, 1o SV.

Von den R-Stämmen: 1 RM, 5 RM, 9 RM, 4 RSV.

Diese resistentenVVarianten zeigten gegen die üblichen Antibiotika keine Änderung ihres Resistenzbildes gegenüber den Orginalstämmen.
Gegen Rifamycin M_{14} traten gehäufter resistente Varianten auf als gegenüber Rifamycin SV.

Der Plattenverdünnungstest:

Die minimale Hemmkonzentration (= MIC) der Orginal- und der R-Stämme im Plattenverdünnungstest nach 24- und 48-stündiger Bebrütung in den Bakterienverdünnungen 1 : 1oo bis 1:: 1 Million ist in den Tabellen Va und Vb, bzw. in den Tabellen VIa und VIb angegeben.

MIC µg/ml					
Stamm	Bakterienverdünnung				
Nr.	1:1oo	1:1ooo	1:1oT	1:1ooT	1:1Mill
1	o,o78	o,o39	o,o39	o,o18	o,oo9
2	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18	o,o18
3	1o,o	o,312	o,312	o,312	o,312
4	o,625	o,312	o,312	o,312	o,oo4
5	o,156	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18
6	o,156	o,o39	o,oo9	o,oo9	o,oo1
7	o,o39	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18
8	o,156	o,o78	o,o78	o,oo9	o,oo2
9	o,625	o,156	o,156	o,o18	o,oo4
1o	o,156	o,o39	o,o39	o,o39	o,oo4
24 std.					

Tab. Va: Minimale Hemmkonzentration (MIC µg/ml) der Orginalstämme im Plattenverdünnungstest nach 24-stündiger Bebrütung in den Bakterienverdünnungen 1:1oo bis 1:1Million.

MIC µg/ml					
Stamm	Bakterienverdünnung				
Nr.	1:1oo	1:1ooo	1:1oT	1:1ooT	1:1Mill
1	o,312	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18
2	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18	o,o18
3	1o,o	o,312	o,312	o,312	o,156
4	o,312	o,312	o,312	o,312	o,oo4
5	o,156	o,o39	o,o39	o,o39	o,o18
6	o,625	o,o78	o,o18	o,oo9	o,oo1
7	o,312	o,o39	o,o78	o,o39	o,o18
8	o,156	o,312	o,o78	o,oo9	o,oo2
9	o,625	o,156	o,156	o,o18	o,oo4
1o	o,312	o,o78	o,156	o,o39	o,oo4
48 std.					

Tab. Vb: Minimale Hemmkonzentration (MIC µg/ml) der Orginalstämme im Plattenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung in den Bakterienverdünnungen 1:1oo bis 1:1Million.

MIC µg/ml					
Stamm	Bakterienverdünnung				
Nr.	1:1oo	1:1ooo	1:1oT	1:1ooT	1:1Mill
1R	o,625	o,312	o,312	o,312	o,312
3R	o,156	o,o78	o,o78	o,o78	o,o39
4R	2o,o	1o,o	5,o	5,o	2,5
5R	2o,o	o,156	o,156	o,156	o,o18
6R	o,156	o,o18	o,o18	o,o18	o,oo2
7R	o,312	o,o39	o,o18	o,o39	o,o18
8R	o,312	o,312	o,o78	o,o39	o,oo4
9R	5,o	2,5	2,5	2,5	o,312
1oR	o,o78	o,o78	o,o78	o,o78	o,o78
24 std.					

Tab. VIa: Minimale Hemmkonzentration (MIC µg/ml) der R-Stämme im Plattenverdünnungstest nach 24-stündiger Bebrütung in den Bakterienverdünnungen 1 : 1oo bis 1 : 1 Million.

MIC µg/ml					
Stamm	Bakterienverdünnung				
Nr.	1:1oo	1:1ooo	1:1oT	1:1ooT	1:1Mill
1R	o,625	o,312	o,312	o,312	o,312
3R	o,156	o,625	o,625	o,625	o,o39
4R	2o,o	1o,o	5,o	5,o	2,5
5R	2o,o	o,156	o,156	o,156	o,o18
6R	o,156	o,o18	o,o18	o,o18	o,oo2
7R	o,312	o,o39	o,o18	o,o39	o,o18
8R	o,312	o,312	o,o78	o,o39	o,oo4
9R	5,o	2,5	2,5	2,5	o,312
1oR	o,625	o,625	o,625	o,156	o,156
48 std.					

Tab. VIb: Minimale Hemmkonzentration (MIC µg/ml) der R-Stämme im Plattenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung in den Bakterienverdünnungen 1 : 1oo bis 1 : 1 Million.

Wie aus Tabelle Va ersichtlich ist, wurden 6 von 1o Orginal-Staphylokokkenstämmen im Plattenverdünnungstest in der Bakterienverdünnung 1 : 1ooo nach 24-stündiger Bebrütung bei Konzentrationen von o,o39 ug/ml völlig gehemmt.
Die MIC der übrigen Stämme lag zwischen o,o78 ug/ml u. o,312ug/ml.
Von den 9 R-Stämmen (Tab. VIa u. VIb) erwiesen sich 2 Stämme als völlig resistent bis zu den Konzentrationen von 2,5 ug/ml und 1o ug/ml.in der Bakterienverdünnung 1 : 1ooo.
Die MIC der übrigen R-Stämme lag zwischen den Konzentrationen o,oo18 ug/ml und o,312 ug/ml.
Die Mittelwerte der minimalen Hemmkonzentrationen und die Variationskoeffizienten der Orginalstämme aus dem Plattenverdünnungstest sind in Tabelle VII angegeben. Vergleichend dazu wird der Mittelwert und Variationskoeffizient der Orginalstämme in der Bakterienverdünnung 1 : 1ooo herangezogen.

	Plattenverdünnungstest					Reihenverdg-Test
	Bakterienverdünnung					
	1:1oo	1:1ooo	1:1oT	1:1ooT	1:1Mill	1:1ooo
S	2,o3	1,o9	1,o6	o,9o	o,33	1,o9
N	9	1o	1o	1o	1o	1o
X	o,225	o,1o9	o,1o6	o,o9	o,o34	o,1o9
	o,23	o,1127	o,1157	o,1149	o,o399	o,o82o
Vc	1o2%	1o3%	1o9%	128%	117%	75,2%
	24 std.					48 std.

Tab. VII: Mittelwerte der minimalen Hemmkonzentration u. Variationskoeffizienten der Orginalstämme aus dem Plattenverdünnungstest in der Bakterienverdünnung 1:1oo bis 1:1Mill. Ablesung nach 24 std. Vergleichend dazu: Mittelwert und Variationskoeffizient der Orginalstämme aus dem Reihenverdünnungstest. Bakterienverdünnung 1:1ooo. Ablesung nach 48 std.

Die graphische Darstellung der Mittelwerte der minimalen Hemmkonzentrationen aus Tabelle VII erfolgte in Abbildung III. Aus ihr ist ersichtlich, daß die Mittelwerte der MIC der Bakterienverdünnungen 1:1ooo, 1:1o ooo und 1:1oo ooo sehr nahe nebeneinander liegen. Ihre Differenz beträgt zwischen den Verdünnungen 1:1ooo und 1:1o ooo o,oo3µg/ml, zwischen 1:1ooo und 1:1oo ooo o,o19 µg/ml.

Ein deutlicher Abfall der Mittelwerte der MIC erfolgt zwischen den Verdünnungen 1:1oo und 1:1ooo, sowie zwischen den Bakterienverdünnungen 1:1oo ooo und 1:1 Million. Dabei wurde bei der Berechnung der Mittelwerte der in der Verdünnung 1:1oo aufgetretene "Springer" bei 1o ug/ml ausgeklammert.

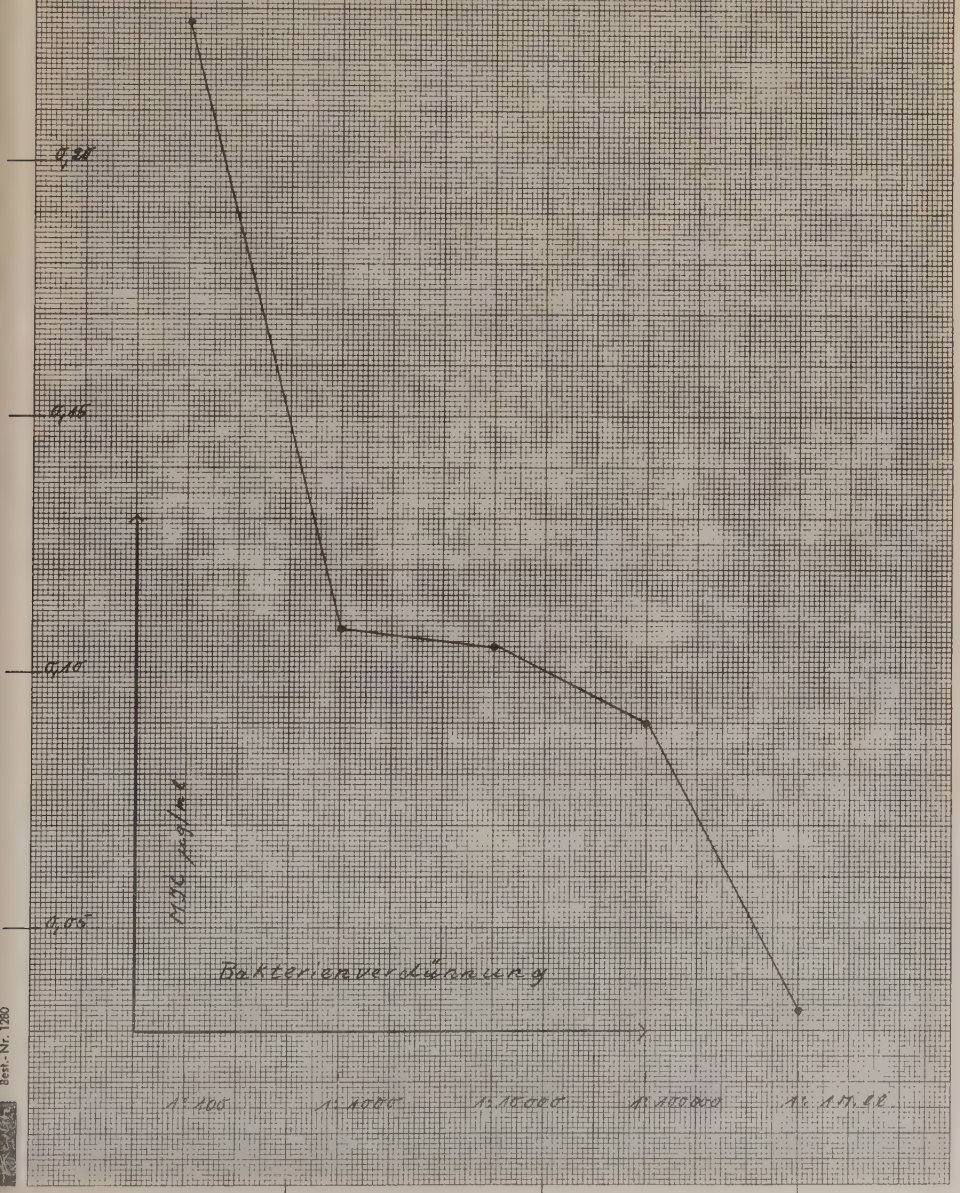
Auf die Angabe der MIC für die Verdünnung 1:1o wurde verzichtet, Ebenso auf die graphische Darstellung ihrer Mittelwerte. Diese liegen bei o,37 µg/ml. Graphisch dargestellt, würde der Abfall der Mittelwerte zwischen den Verdünnungen 1:1o und 1:1oo ein ähnlicher sein, wie der zwischen den Verdünnungen 1:1oo und 1:1ooo.

In Tabelle VIII sind die MIC der Orginalstämme aus dem Plattenverdünnungstest mit denen aus dem Reihenverdünnungstest in der Bakterienverdünnung 1:1ooo verglichen.

Plattenverdünnungstest			Reihenverdünnungstest	
Stamm	MIC µg/ml			
1	o,o39	o,o39	o,oo97	o,o39
2	o,o39	o,o39	o,oo97	o,o39
3	o,312	o,312	o,oo97	o,156
4	o,312	o,312	o,oo97	o,o78
5	o,o39	o,o39	o,oo97	o,o78
6	o,o39	o,o78	o,oo97	o,o78
7	o,o39	o,o39	o,oo97	o,o78
8	o,o78	o,312	o,oo97	o,o78
9	o,156	o,156	o,oo97	o,o78
1o	o,o39	o,o78	o,oo97	o,156
	24std.	48std.	24std.	48std.

Tab. VIII: Vergleich der MIC im Platten- u.Reihenverdünnungstest in d. Konzentration 1:1ooo

Abb. III: Mittelwerte der nach 24 std. ermittelten MIC d. Orginalstämme aus dem Plattenverdünnungstest mit Rif. M_{44} in Abhängigkeit zur Bakterienverdünnung.



Best.-Nr. 1280

Wie aus Tabelle VII hervorgeht, sind in der Bakterienverdünnung 1 : 1ooo die Mittelwerte der minimalen Hemmkonzentrationen aus dem Reihenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung mit denen aus dem Plattenverdünnungstest nach 24-stündiger Bebrütung identisch.
Der Variationskoeffizient des Reihenverdünnungstestes liegt dagegen um 25% niedriger als der des Plattenverdünnungstestes.
Ein weiterer Vergleich zeigt, daß im Plattenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung kein Nachwachsen in höhere Konzentrationen erfolgte, im Reihenverdünnungstest dagegen bis nach 6-tägiger Bebrütung ein Nachwachsen in die nächst höhere Konzentration beobachtet wurde.
Die jedoch sowohl aus dem Reihen-, wie aus dem Plattenverdünnungstest angelegten Subkulturen auf hemmstoffreien Medien zeigten selbst nach 8-tägiger Bebrütung kein Keimwachstum, was die bakterizide Wirkung des Antibiotikums beweist.

Resistente Varianten:

Die im Jahre 1962 aus den Orginalstämmen gewonnenen "resistenten Varianten" (durch G. Linzenmeier) und hier als R-Stämme bezeichnet, die bei erneuten Versuchen 1963 (G. Linzenmeier) ihre ursprüngliche Resistenz bewahrt hatten, zeigten 1965 in unseren Versuchen eine deutliche Abnahme ihrer Resistenz.
Ihre minimale Hemmkonzentration betrug im Reihenverdünnungstest annähernd o,312 ug/ml. Lediglich die MIC des Stammes 4R lag bei 2o ug/ml, die des Stammes 9R bei 1o ug/ml.
Die in unseren Versuchen gewonnenen resistenten Varianten erwiesen sich im Plattenverdünnungstest bis zu der Konzentration von 2o ug/ml in den Bakterienverdünnungen 1:1o bis 1:1o ooo als völlig resistent.
Erst in der Verdünnung 1 : 1oo ooo war eine deutliche Zunahme der Empfindlichkeit bemerkbar.
Im Reihenverdünnungstest wurden diese resistenten Varianten nach 24-stündiger Bebrütung bei der Konzentration 8o ug/ml Rifamycin M_{14} nicht gehemmt.

Während resistente Varianten im Hemmhoftest am leichtesten gezüchtet werden konnten, wobei sie sich bereits nach 2 Passagen als völlig resistent erwiesen und ebenso im Plattenverdünnungstest in der Konzentration 1:1oo resistente Varianten auftraten, konnten sogenannte "Springer" nur bei Stamm 5R und Orginalstamm 5 beobachtet werden. D.h., bei einer Rifamycinkonzentration von 1o µg/ml trat bereits nach 24-stündiger Bebrütung eine deutliche Trübung auf, während der übrige Stamm schon bei der Konzentration von o,o39 µg/ml gehemmt wurde.
Selbst nach 6-tägiger Bebrütung trat kein weiterer "Springer" auf, während der übrige Stamm bis zur Konzentration von o,o78 µg/ml nachwuchs.
Im Hemmhoftest erwiesen sich diese Springer als voll empfindlich, mit Hemmhöfen von 32 und 3o mm.
Im Plattenverdünnungstest zeigten sie ein von ihren Orginalstämmen völlig abweichendes Bild. Diese "Springer" traten hier in den Verdünnungen 1:1oo und 1:1ooo nur in der Konzentration von 2oµg/ml auf, während sie zwischen den Konzentrationen von 2o µg/ml bis o,156 µg/ml, bzw. o,312 µg/ml nicht beobachtet wurden.
Dieses Phänomen konnte über mehrere Passagen verfolgt werden.
Auf antibiotikafreien Medien zeigten sie in ihrem Wachstum keinen Unterschied gegenüber ihren Orginalstämmen.
Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß der bei Orginalstamm 5 aufgetretene Springer mit dem bei Stamm 5R aufgetretenem Springer identisch ist. Es scheint sich also hier um eine konzentrationsabhängige Mutante zu handeln, die regelmäßig beobachtet werden konnte.

IV) Diskussion

Hemmhoftest:

Die im Hemmhoftest gewonnenen Ergebnisse bestätigen die von Füresz (7), Timbal (3o) und Linzenmeier (11) beschriebene gute Wirksamkeit von Rifamycin SV gegen Staphylokokken.
Nach 24-stündiger Bebrütung wurden Hemmhofdurchmesser von 3o mm bis 46 mm abgelesen.
Rifamycin M_{14} wies eine ähnliche Wirksamkeit auf. Der Vergleich der mit beiden Antibiotika erzielten Hemmhofdurchmesser ergab keinen signifikanten Unterschied.
Bei weiterer Bebrütung über 48- und 72-Stunden konnte in den meisten Fällen eine konzentrische Verkleinerung der Hemmhöfe durch Nachwachsen am Hemmhofrand beobachtet werden. Dabei stiegen Abweichungen und Variationskoeffizienten für Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} mit der Ablesungszeit an, die von Rifamycin SV wiesen jedoch einen flacheren Verlauf auf.
Die Ursache dieser konzentrischen Verkleinerung der Hemmhöfe kann in einer Abnahme der Stabilität von Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} gesehen werden. Für diese Stabilitätsabnahme spricht der Anstieg der Abweichungen und Variationskoeffizienten mit der Ablesungszeit.
Da die Anstiege der Abweichung und des Variationskoeffizienten für Rifamycin SV einen flacheren Verlauf aufweisen, kann angenommen werden, daß die Diffusion von Rif.SV regelmäßiger erfolgt und daß es zudem eine etwas größere Stabilität besitzt als Rifamycin M_{14}. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.
Daraus läßt sich ableiten:

1) Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} weisen im Hemmhoftest sowohl gegenüber den von uns getesteten 1o Orginal-Staphylokokkenstämmen als auch gegenüber den R-Stämmen keinen Unterschied in ihrer Wirksamkeit auf.

2) Ein signifikanter Wirkungsverlust der Antibiotika war selbst nach 72-stündiger Ablesung nicht zu verzeichnen.

Plattenverdünnungstest und Reihenverdünnungstest:

Die von Monnier und Bourse (16) angegebenen niedrigen MIC von o,o1 µg/ml für Rifamycin SV konnten wir mit Rifamycin M_{14} in unseren Versuchen im Plattenverdünnungstest nicht bestätigen. Die hier für Rifamycin M_{14} ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen lagen zwischen o,o39 µg/ml und o,312 µg/ml. Ähnlich hohe Konzentrationen werden von Welsch und Esther angegeben. (32) G. Linzenmeier (12) beschreibt in seinen Versuchen mit Rifamycin SV im Reihenverdünnungstest MIC von o,o45 µg/ml bis o,o19 µg/ml nach 24-stündiger Bebrütung. Diese Ergebnisse lassen sich von uns auch für Rifamycin M_{14} im Reihenverdünnungstest mit einer gewissen Einschränkung bestätigen.
Da nämlich die von uns erzielten MIC im Reihenverdünnungstest nach 24-stündiger Bebrütung für die 1o Orginalstämme bei derselben Konzentration von o,oo97 µg/ml lagen, zogen wir die nach 48-stündiger Bebrütung ermittelten MIC zum Vergleich heran, die Werte zwischen o,o39 µg/ml und o,156 µg/ml aufwiesen. Dabei kamen wir zu der Feststellung, daß die Mittelwerte dieser MIC mit den Mittelwerten der MIC des Plattenverdünnungstestes nach 24-stündiger Bebrütung identisch waren.
Der Variationskoeffizient des Reihenverdünnungstestes war jedoch gegenüber dem des Plattenverdünnungstestes um 25% erniedrigt. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß die Wirkung von Rifamycin M_{14} im Reihenverdünnungstest eine etwas verzögertere und deshalb regelmäßigere ist, als die im Plattenverdünnungstest. Das beweist auch die Tatsache, daß im Plattenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung kein Nachwachsen in höhere Konzentrationen erfolgte, im Reihenverdünnungstest dagegen bis nach 6-tägiger Bebrütung ein Nachwachsen in die nächst höhere Konzentration beobachtet wurde.
Die jedoch auf hemmstoffreien Medien angelegten Subkulturen aus dem Platten-, wie aus dem Reihenverdünnungstest zeigten selbst nach 8-tägiger Bebrütung kein Keimwachstum. Damit wird bewiesen, daß Rifamycin M_{14} von den Konzentrationen o,312 µg/ml bzw. o,156 µg/ml an bakterizid gewirkt hatte.
Ähnliche Ergebnisse erzielte Linzenmeier mit Rifamycin SV. (12)

Resistente Varianten:

Bei allen Stämmen traten im Hemmhoftest nach 24- bis 72-stündiger Bebrütung Kolonien auf, die sich als nicht regelmäßig resistent erwiesen.
Wir konnten eine Abhängigkeit des Resistenzgrades dieser Einzelkolonien vom Zeitpunkt ihres Auftretens im Hemmhof und ihres Abstandes zum Testplättchen beobachten.
Als resistente Varianten mit bleibender Resistenz erwiesen sich nur Einzelkolonien, die bereits nach 24-stündiger Bebrütung mit einer Entfernung von maximal 1o mm zum Testplättchen aufgetreten waren.
Kolonien, die dagegen erst nach 2- bis 5-tägiger Bebrütung innerhalb der Hemmhöfe sichtbar wurden, erwiesen sich nicht als resistente Varianten, d.h., sie zeigten im erneut durchgeführten Hemmhoftest ihre ursprüngliche Empfindlichkeit.
Es ist also anzunehmen, daß es sich bei diesen Kolonien um Keime handelte, die "übrig blieben", die also erst nach einem gewissen Wirkungsverlust des Antibiotikums auftraten.
Resistente Varianten wurden gegenüber Rifamycin M_{14} im Hemmhoftest gehäuft beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache könnte in der bereits diskutierten unregelmäßigeren Diffusion und geringeren Stabilität von Rifamycin M_{14} gesehen werden.
Die von G. Linzenmeier 1962 isolierten resistenten Varianten, die über ein Jahr Aufbewahrung ihre Resistenz bewahrt hatten, (Versuche von 1963 durch G. Linzenmeier) zeigten in unseren Versuchen eine deutliche Abnahme ihrer Resistenz. Nur 2 von 9 der damals resistenten Stämme wiesen minimale Hemmkonzentrationen von 1o µg/ml bzw. 2o µg/ml auf. Die MIC der übrigen R-Stämme lagen bei o,312 µg/ml, waren also denen der Orginalstämme ähnlich. Dieser Verlust der Resistenz spricht dafür, daß diese nicht fest verankert ist.
Als besondere Art resistenter Varianten sind die sogenannten "Springer" zu betrachten.
Wir konnten in unseren Versuchen 2 solche Springer bei Orginalstamm 5 und Stamm 5R beobachten. Nach ihrem gesamten Resistenzbild zeigten sie sich jedoch als identisch.

Im Unterschied zu den resistenten Varianten wiesen sie eine strenge Konzentrationsabhängigkeit auf.
Es ist also anzunehmen, daß es sich bei diesen Springern zwar um resistente Varianten handelt, die jedoch nur als konzentrationsabhängige Mutanten auftreten.

V) Zusammenfassung

Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} zählen zu den halbsynthetischen Rifamycinen.
An Hand dieser Arbeit wurde ihr Verhalten gegenüber koagulasepositiven Stämmen von Staphylococcus aureus und an resistenten Varianten dieser Stämme geprüft.
Dabei konnte folgendes gezeigt werden:

1) Im Hemmhoftest wurden nach 24-stündiger Bebrütung Hemmhöfe von 3o mm bis 46 mm Durchmesser abgelesen. Bei weiterer Bebrütung über 48- und 72-Std. verkleinerten sich die Hemmhöfe konzentrisch durch Nachwachsen am Hemmhofrand. Die Hemmhofgröße nach 72-std. Bebrütung war jedoch gegenüber der nach 24 Std. ermittelten nicht signifikant erniedrigt.
Ebenso ergab der Vergleich der von Rifamycin SV und Rifamycin M_{14} erzielten Hemmhofdurchmesser keinen signifikanten Unterschied.
Bei beiden Testsubstanzen traten bereits nach 24-stündiger Bebrütung Einzelkolonien auf. Diese Kolonien zeigten jedoch keine regelmäßige Resistenz. Ihr Resistenzgrad war vom Zeitpunkt ihres Auftretens im Hemmhof und vom Abstand zum Testplättchen abhängig.

2) Im Plattenverdünnungstest lag die MIC (minimale Hemmkonzentration) von Rifamycin M_{14} bei 6 von 1o Orginalstaphylokokkenstämmen in der Verdünnung 1:1ooo bei o,o39 µg/ml.
Die graphische Darstellung der Mittelwerte der MIC der Orginalstämme in den Verdünnungen 1:1o bis 1:1Mill. und ihr Vergleich erbrachten folgendes Ergebnis:
Die Mittelwerte der MIC der Bakterienverdünnungen 1:1ooo, 1:1o ooo und 1:1oo ooo liegen nahe nebeneinander.
Ihre Differenz beträgt zwischen den Verdünnungen 1:1ooo und 1:1o ooo o,oo3 µg/ml, zwischen 1:1ooo und 1:1oo ooo beträgt sie o,o19 µg/ml.
Ein deutlicher Abfall der MIC ist zwischen den Verdünnungen 1:1oo und 1:1ooo, sowie zwischen den Verdünnungen 1:1oo ooo und 1:1Mill. zu beobachten.

3) Reihenverdünnungstest: In den Verdünnungen 1:1ooo sind die Mittelwerte der MIC aus dem Reihenverdünnungstest nach 48-stündiger Bebrütung mit den nach 24 Stunden abgelesenen Mittel-

-werten der MIC aus dem Plattenverdünnungstest identisch.
Im Platten- und im Reihenverdünnungstest bewies Rifamycin M_{14} eine bakterizide Wirkung.

4) Resistente Varianten: Die 1962 aus den Orginalstämmen gewonnenen resistenten Varianten (durch G. Linzenmeier), zeigten in unseren Versuchen eine deutliche Resistenzabnahme. Ihre MIC lag annähernd bei o,312 µg/ml. Lediglich 2 von 9 Stämmen wiesen eine MIC von 1o µg/ml und 2o µg/ml auf, d.h., erwiesen sich als resistent.
Die in unseren Versuchen gewonnenen resistenten Varianten zeigten sich in den Verdünnungen 1:1o bis 1:1o ooo als völlig resistent bis zu einer Konzentration von 2o µg/ml.
Im Reihenverdünnungstest wurden sie von der Konzentration 8oµg/ml nicht gehemmt.
Während resistente Varianten am leichtesten im Hemmhoftest gezüchtet werden konnten und sich bereits nach 2 Passagen als völlig resistent erwiesen und ebenso in der Verdünnung 1:1oo gehäuft resistente Varianten auftraten, konnten sogenannte "Springer" nur bei Orginalstamm 5 und Stamm 5R im Reihenverdünnungstest bei einer Konzentration von 1o µg/ml beobachtet werden. Der übrige Stamm wurde bereits bei einer Konzentration von o,o39 µg/ml gehemmt. Diese "Springer" erwiesen sich als identisch und zeigten über mehrere Passagen eine konstante Konzentrationsabhängigkeit.

VI) Literaturverzeichnis

1) Albores, I.M., Franchio, I.C., Kofmann, I., Caruso, E.: Aislamiento de cepas de Staphylococcus aureus en portadores y medio ambiente hospitalario y estudio de su sensibilidad a diversos antibioticos con especial referencia a la rifamicina SV. Chemotherapia 7: 259-268, 1963

2) Aratani, H., Jamanaka, J., Nakagawa, A., Hinoi, H., Nakamura, S.J.: Pharmacological study on a new antibiotic, Rifamycin SV. Antibiot. (B) (Tokyo) 16: 312 -316 1963 Jap.

3) Cassano, A., Filice, A., Costa, C., Trimarco, C.: La rifomicina SV: studio in vitro dell' attivita antibatterica. Clin. ter., 21 bis, supp. 4: 269 - 278, 1961

4) Curci, G., Ninni, A.: Local tolerance, absorption and elimination of rifomycin SV . (experimental observations in laboratory, animals and research in man) Arch. Tisiol. 16: 1o79 - 1123 , 1961

5) Curci, G., Ninni, A.: Indagini sperimentale sulla natura fisicochimica e sulla importanza pratica dei legami fra Rifamicina SV, polivinilpirrolidone e proteine. Arch. Tisiol. 18: 19o - 22o , 1963

6) Cho, N.K., Sunada, I., Nohara, S.: Clinical studies on a new antibiotic, Rifamycin SV. Showa Med. Ass. 23: 86 - 87, 1963 Jap.

7) Füresz, S., Timbal, M.T.: Antibacterial activity of rifamycins. Chemotherapia 7: 2oo - 2o8 , 1963

8) Herrera Malmsten, L., Borras Cuesta, F., Herrera Carvajal, C.: Estudio experimental de la rifamicina SV. Chemotherapia 7: 621 - 635 , 1963

9) Jadin, I.M., Wery, M.: Etude de l'activité d'un nouvel antibiotique, la rifamycine SV. Chemotherapia 7: 242 - 252 , 1963

1o) Linzenmeier, G.: Zur Bewertung einer vereinfachten Hemmhofmethode. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 167:327, 1957

11) Linzenmeier, G.: In vitro-Versuche mit Rifamycin SV gegenüber Staphylococcus aureus. Chemotherapia 7: 236 - 241 1963

12) Maffii, G., Bianchi, G., Schiatti, P., Gallo, G.G.: Rifomycin XIX. Absorption, bilary excretion and distribution of rifomycin SV. Farmaco, Ed. sci. 16: 246-262 1961

13) Maffii, G., Schiatti, P., Bianchi, G.: Distribzione della rifamicina SV nell' organismo animale. Aspetti farmacologici e orientamenti terapeutici. Chemotherapia 7: 158-169 , 1963

14) Maffii, G., Schiatti, P., Bianchi, G., Serralonga, M.G.: Rifomycin XVIII. Pharmacological studies with rifomycin SV. Farmaco, Ed. sci. 16: 235-246 , 1963

15) Monaldi, V.: L' impiego della rifamicina SV nella tubercolosi. Direttive pratiche. Chemotherapia 7: 569-576 , 1963

16) Monnier, J., Bourse, R.: Quelques resultats bactériologiques de l'etude in vitro de la rifamycine SV. Chemotherapia 7: 22o-235 , 1963

17) Neuhold, R.: Erfahrungen mit Rifamycin SV. Chemotherapia 7: 253-258 , 1963

18) Nitti, V.: Attività antimicobatterica della rifamicina SV in vitro. Arch. Tisiol. 18: 177-183 , 1963

19) Nitti, V., Virgilio, R., Ninni, A.: Attività della rifomicina SV sui micobatteri in vitro. Arch. Tisiol. 16: 1o23-1o31 , 1961

2o) Perlog, V.: Über die Konstitution der Rifamycine. Chemotherapia 7: 133-136 , 1963

21) Ruiloba, J.: Experiencias con la rifamicina SV: iforme preliminar. Chemotherapia 7: 379-387 , 1963

22) Sensi, P.: Nuovi derivati della rifamicina B ad elevata attività antibatterica. Res. Progr. org. biol. med. Chemo. 1: 337-346 , 1964

23) Sensi, P., Ballotta, R., Greco, A. M., Gallo, G.G.: Rifomycin XV. Activation of rifomycin B and rifomycin O. Production and properties of rifomycin S and rifomycin SV. Farmaco, Ed. sci. 16: 165-179 , 1961

24) Sensi, P., Greco, A.M., Gallo, G.G., Timbal, M.T.: Rifomycin VI. Chemical and biological correlations between some derivatives of rifomycin B and rifomycin O. Farmaco, Ed. sci. 15: 235-251 , 196o

25) Sensi, P., Timbal, M.T., Greco, A.M.: Rifamycin XXV . Derivatives of rifamycin O with high antimicrobial activity. Chemother., N.Y. 12: 488-511 , 1962

26) Sensi, P., Timbal, M.T., Maffii, G.: Rifomycin IX . Two new antibiotics of rifomycin-family: rifomycin S and rifomycin SV. Experientia 16: 412-428 , 1960

27) Sensi, P., Margalith, P., Timbal, M.T.: Rifomycin, a new antibiotic. Preliminary report. Farmaco, Ed. sci. 14: 146-161 , 1959

28) Sensi, P., Greco, A.M., Ballotta, R.: Rifomycin I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin-complex. Antibiot. Ann. p. 262-279 , 1959-60

29) Sensi, P., Maggi, N., Ballotta, R.: Orientamenti nella ricerca dienuove rifamicine semisintetiche. Chemotherapia 7: 137-144 , 1963

30) Timbal, M.T., Pallanza, R., Carnitti, G.: Rifomycin XVI. Bacteriological studies of rifomycin SV in vitro. Farmaco, Ed. sci. 16: 182-198 , 1961

31) Tsukamura, M., Tsukamura, S.: Antituberculous action of rifamycin SV. In vitro and in vivo studies. J. Antibiot. ser. A (Tokyo) 15: 216-254, 1962

32) Welsch, M., Esther, H.: Observations sur les activités anti-bactériennes in vitro des rifamycines B et SV. Chemotherapia 7: 269-279 , 1963

Herrn Professor Dr. G. Linzenmeier möchte ich für die Überlassung des Themas und für die wertvollen Anregungen während der Durchführung der Untersuchungen meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt ferner den Damen des Labors.

L E B E N S L A U F

Am 1.6.39 wurde ich als erstes Kind des Kaufmanns Hans Schödl und seiner Ehefrau Anna, geb. Lohm in Bruck/CSSR geboren.
Vom Jahre 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Lohkirchen, Obb.
Im September 1950 trat ich in die Realschule der "Englischen Fräulein" in Altötting ein, die ich 1956 mit dem Zeugnis der Mittleren Reife verließ. Vom September 1956 bis Februar 1958 besuchte ich das Realgymnasium Niedernburg in Passau und anschließend die Deutsche Schule in Brüssel/Belgien. Dort legte ich im März 1959 das Abitur ab.
Im Sommersemester 1959 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximillians-Universität München.
Hier legte ich im Wintersemester 1959/60 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Wintersemester 1961/62 die ärztliche Vorprüfung ab.
Nach sechs klinischen Semestern beendete ich mein Studium am 4.8. 1965 mit dem medizinischen Staatsexamen.
Im September 1965 trat ich meine erste Medizinalassistentenstelle im Kreiskrankenhaus Burghausen an. Nach 2-jähriger Medizinalassistentenzeit erhielt ich im September 1967 die Approbation.
Seit diesem Zeitpunkt bin ich ununterbrochen als Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Mühldorf tätig.
Im August 1968 heiratete ich den jordanischen Arzt Dr. Issa Hattar.